

学位論文要旨

学位授与申請者

氏名 清野 珠美

学位論文

題目：Study on pyroglutamyl peptides in Japanese rice wine, Sake.

(日本酒中のピログルタミルペプチドに関する研究)

Chapter 1: General introduction. (緒言)

日本酒は、蒸米、水、乳酸から作られる、わが国の伝統的な発酵アルコール飲料である。この日本酒は、黄麹菌 (*Aspergillus oryzae*) による米デンプンの糖化と、清酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) によるアルコール発酵が同時に進行するという、並行複発酵により製造される。*A. oryzae* はアミラーゼ、プロテアーゼを菌外へ分泌するため、日本酒醸造中には、米由来のタンパク質およびデンプンから多くのオリゴ糖やアミノ酸、ペプチドが生成される。

アミノ酸の 1 つであるグルタミンは、水溶液中で環化し、ピログルタミン酸に変換される。このピログルタミン酸をアミノ末端に持つペプチドを“ピログルタミルペプチド”と呼ぶ。このピログルタミルペプチドは食品タンパク質加水分解物に広く分布しており、近年、小麦グルテン加水分解物から肝保護作用および大腸炎抑制作用を持つピログルタミルロイシン (pyroGlu-Leu) が同定された。この報告は、食品中のピログルタミルペプチドがヒトの健康に対して有益な効果を持つことを示唆する。しかし、発酵食品に含まれるピログルタミルペプチドについては、ほとんど研究報告例がない。

そこで本研究では、発酵食品に含まれるピログルタミルペプチドの基礎的知見を得るため、無塩の発酵食品の 1 つであり、プロテアーゼ、ペプチダーゼ活性の高い *A. oryzae* を用いて製造される日本酒中のピログルタミルペプチドの同定と、そのペプチドの機能の一旦を明らかにすることを目的とした。

Chapter 2: Identification of pyroglutamyl peptides from sake: presence of hepatoprotective pyroGlu-Leu. (日本酒からのピログルタミルペプチドの同定および肝保護作用を持つ pyroGlu-Leu の存在)

市販されている日本酒から 19 種類の短鎖ピログルタミルペプチドを分離、同定し、pyroGlu-Leu (pEL) と pyroGlu-Gln が主要ペプチドであることを明らかにした (日本酒ピログルタミルペプチド中、約 36.2%および 21.3%)。pEL は、すでに動物モデルにおいて肝炎および大腸炎を抑制することが明らかにされている。市販の日本酒 (n = 5) には 40–60 μM (10–15 mg/L) の濃度で pEL が含まれていた。また、日本酒醸造中の酒母や醪では、継時的に pEL 濃度が増加していた。しかし、熱処理した麹抽出液を用いた酵母培養では、pEL 濃度は増加しなかった。さらに酒母発酵中に ^{13}C -Leu を過剰に添加しても、pyroGlu- ^{13}C -Leu の割合は増加しなかった。一方で、蒸米を *A. oryzae* 由来プロテアーゼによって消化することで、pEL 濃度は増加した。これらの結果は、日本酒中の pEL が、*A. oryzae* 由来プロテアーゼによる米タンパク質分解により生成されており、pEL 生成に対して酵母の存在は必須ではないことが示唆された。

Chapter 3: Identification of pyroglutamyl peptides with protective effect against dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice from sake. (マウスにおけるデキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 誘発性大腸炎保護作用を持つ日本酒ピログルタミルペプチドの同定)

日本酒 5 倍濃縮物を大容量等電点電気泳動法 (Autofocusing) を用いて、pH により 10 画分に分画し、DSS 誘発性大腸炎マウスに投与した。酸性・高濃度ペプチド画分である画分 8 を経口投与させたマウス群では、コントロール群と比較して Disease activity index (DAI) score が有意に低下し、炎症改善効果を示した。一方で酸性・低濃度ペプチド画分である画分 1-5 や塩基性画分である画分 10 を投与させたマウス群では、炎症増悪傾向が見られた。また分画前の日本酒濃縮物投与群は大腸炎改善効果が見られなかった。この画分 8 を調製用逆相クロマトグラフィーにより 4 画分に分画し、同様に DSS 誘発性大腸炎マウスに投与させた。この中で画分 3 投与群は、コントロール群と比較して、有意に体重減少が抑制された。この画分 3 から、pyroGlu-Tyr, pyroGlu-Asn-Ile (pENI), pyroGlu-Asn-Ile-Asp-Asn-Pro が、ピログルタミルペプチドとして同定された。それぞれ単独での DSS 誘発性大腸炎に対する抑制効果を検証した結果、pENI が、1.0 mg/kg 経口投与で有意な大腸炎抑制効果を示した。この pENI は、日本酒から同定された新規の機能性ピログルタミルペプチドである。

Chapter 4: Preparation of rice-fermented beverage with protective activity against DSS-induced colitis in mice. (マウスにおける DSS 誘発性大腸炎保護作用を持つ米発酵飲料の調製)

酵母を添加せず、麴のみを用いた大腸炎抑制作用を持つ米発酵飲料の作成を試みた。麴米 (精米歩合 90%)、蒸米、水を混合し、高温 (55°C) で 4 時間糖化を保持した米高温発酵物では、pyroGlu-Leu (pEL) (約 20 μ M) と pyroGlu-Tyr (約 4 μ M) が検出されたが、pyroGlu-Asn-Ile や pyroGlu-Asn-Ile-Asp-Asn-Pro は検出されなかった。一方、麴米 (精米歩合 90%)、水、乳酸を混合し、20°C で 2 週間発酵させた米低温発酵物では、pyroGlu-Leu を 100 μ M 程度含有し、市販の日本酒中 pEL よりも高濃度であった。その他の 3 ペプチドでも、市販の日本酒中濃度に近い濃度を持っていた。この 2 サンプルを、3.0 mg 総ペプチド/kg 体重で DSS 誘発性大腸炎マウスに投与した結果、高温発酵物投与群では改善効果が見られなかったのに対し、低温発酵物投与群では、コントロール群と比較して、有意に DAI score が低下し、大腸炎改善効果が得られた。

Chapter 5: General discussion and conclusion (総括)

本研究では、日本酒に含まれる短鎖のピログルタミルペプチドを網羅的に解析し、19 種類のピログルタミルペプチドを同定した。これは日本酒に含まれるピログルタミルペプチドの構造に関する最初の知見である。同定されたペプチドの 1 つである pyroGlu-Leu (pEL) は、小麦グルテン加水分解物から肝保護作用ペプチドとして同定された既知の成分であったが、日本酒中に比較的高濃度で存在していた。また、pEL 以外にも、pyroGlu-Asn-Ile がマウスへの 1.0 mg/kg の単独経口投与で、DSS 誘発性大腸炎を有意に改善した。

日本酒は Autofocusing による分画を行うことで大腸炎改善効果を示した。これは日本酒に DSS 誘発性大腸炎を増悪する成分と改善する成分の両方が存在し、Autofocusing によって両成分を分離可能であることを示している。また、酵母を添加せず、麴、米、水 (および乳酸) のみで発酵物を作成し、大腸炎改善効果を検証した結果、甘酒に近い製法である高温短期間発酵よりも、日本酒醸造条件に近い低温長期間発酵において、高い DSS 誘発性大腸炎改善効果が得られた。この発酵物は、酵母を添加しない低アルコール飲料であり、ヒトへの投与が容易であると考えられる。今後、ヒト試験での麴を用いた米低温長期発酵物摂取による大腸炎改善効果とそのメカニズムの解明が必要である。